

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° d'publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 652 092

②1 N° d'enregistrement national :

89 12608

⑤1 Int Cl⁸ : C 12 Q 1/28

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

7 A1

②2 Date de dépôt : 15.09.89.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 22.03.91 Bulletin 91/12.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *Société Anonyme dite: FAMA — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : *Revol André et Aguetant Daphné
épouse d'Arcy*

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : *Cabinet Germain et Maureau.*

⑤4 Procédé de mesure de l'activité peroxydase de la glaire cervicale.

⑤7 Ce procédé consiste, après prélèvement de la glaire, à
diluer celle-ci, puis à y ajouter un peroxyde et un système
de réactifs de révélation réagissant immédiatement, four-
nissant une gamme de colorations appréciables à l'œil nu
et stables dans le temps pendant plus de 15 minutes.

Application à la détermination de la date de période ovi-
latoire chez la femme.

FR 2 652 092 - A1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFR 8912608
FA 432685

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	US-A-4 614 715 (J.C.M. TSIBRIS et al.) * Résumé; colonne 2, lignes 3-11, 41-55 *	1,3,9
X	FR-A-2 183 240 (NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORP.) * Page 3, ligne 4 - page 4, ligne 20; page 7, ligne 25 - page 8, ligne 23; revendication 21 *	1,3,4,9
X	CONTRACEPTION, vol. 25, no. 1, janvier 1982, pages 59-67; J.C.M. TSIBRIS et al.: "Guaiacol peroxidase levels in human cervical mucus: A possible predictor of ovulation" * Pages 59-60, 66 *	1,3,9
X	WO-A-8 002 596 (G. OSTER et al.) * Page 2, ligne 12 - page 6, ligne 35 *	1,3,5,6 ,9
Y	ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 105, 1980, pages 389-397; T.T. NGO et al.: "A sensitive and versatile chromogenic assay for peroxidase and peroxidase-coupled reactions" * Pages 389-391 *	1,3,5,6 ,9
A	FERTILITY AND STERILITY, vol. 41, no. 5, mai 1984, pages 693-703; W.A. ANDERSON et al.: "Cervical mucus peroxidase is a reliable indicator for ovulation in humans" * Pages 693-699 *	1,3,9
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
15-03-1990		HITCHEN C.E.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

DOMAINES TECHNIQUES
RECHERCHES (Int. Cl.5)

C 12 Q

REVENDICATIONS

1 - Procédé de mesure de l'activité peroxydase de la glaire cervicale, caractérisé en ce qu'il consiste, après prélèvement de la glaire, à diluer celle-ci, puis à y ajouter un peroxyde et un système de réactifs de révélation réagissant immédiatement, fournissant une gamme de colorations appréciables à l'oeil nu et stables dans le temps pendant plus de 15 minutes.

2 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il consiste à réaliser la fluidification de la glaire à l'aide de ficine.

10 3 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que le peroxyde est liquide et constitué par de l'eau oxygénée.

15 4 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que le peroxyde est solide et constitué par du peroxyde d'urée.

5 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le système de réaction colorée comprend un mélange de :

- MBTH : diméthylbenzothiazoline hydrazone et de
- 20 - DMAB : acide diméthylaminobenzoïque.

6 - Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le rapport des concentrations DMAB/MBTH est de l'ordre de 50/1.

7 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 5 et 6, caractérisé en ce que la concentration de DMAB est de 2,2 mM.

25 8 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il consiste à conduire la réaction à un pH de l'ordre de 5.

30 9 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que les réactifs sont mis en oeuvre sous une forme liquide.

10 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que les réactifs sont intégrés dans un gel de polymères organiques et sont mis en oeuvre sur un support constitué par une bandelette ou un film gélifié.

La présente invention a pour objet un procédé de mesure de l'activité peroxydase de la glaire cervicale, plus spécialement destiné à permettre de déterminer, chez la femme, la date de période ovulatoire dans un but d'aide à la maîtrise de la fécondité, qu'il s'agisse d'éviter ou de profiter de la période fertile.

Le cycle ovarien chez la femme se déroule sur environ vingt-huit jours et est divisé en deux phases de quatorze jours chacune, séparées par l'ovulation :

- une phase folliculaire débutant avec la menstruation, correspondant à la maturation d'un follicule, et se terminant par la rupture folliculaire et la libération du gamète femelle : l'ovule ;
- une phase lutéale qui correspond à la transformation de la granulosa du follicule ovarien mûre en corps jaune, puis à la régression du corps jaune s'il n'y a pas eu fécondation de l'ovule par un spermatozoïde.

Le cycle menstruel s'accompagne de modifications de la sécrétion d'un certain nombre d'hormones qui permettent de déterminer de façon plus ou moins précise la période d'ovulation.

Les moyens biologiques de détection de la période ovulatoire du cycle reposent notamment :

- sur la mesure des variations des concentrations hormonales dans le sang, l'urine, la salive, etc... ;
- sur l'étude des modifications physiologiques qui rendent compte des effets à distance des hormones sécrétées par l'ovaire : modification de la glaire cervicale, augmentation de la température corporelle....

Une première possibilité pour déterminer la période d'ovulation consiste à réaliser le dosage de l'hormone lutéinisante (LH).

La sécrétion de la LH, hormone qui contrôle les sécrétions ovariennes varie au cours du cycle. En effet, 16 à 36 heures avant l'ovulation, un pic de LH est observé dans le sang. Les tests traditionnels reposent sur la mise en évidence d'un pic de LH après mise en oeuvre d'une réaction effectuée sur l'urine du matin. La coloration obtenue est lue par rapport à une gamme d'étalonnage. Toutefois, ce dosage permet de confirmer l'ovulation, mais non de la prédire puisque le pic urinaire survient dans les 24 heures précédant l'ovulation, et qu'il pré-

sente un retard de quelques heures par rapport au pic sanguin.

Une seconde solution consiste à réaliser le dosage d'hormones salivaires. En effet, les variations cycliques des sécrétions hormonales constatées dans le sang sont également trouvées dans la salive. Toutefois, les dosages réalisés à ce jour sont réservés à des laboratoires spécialisés. Enfin, le pic apparaissant sur la courbe tracée ne précède que de 24 heures le pic obtenu par mesure de la LH.

Une autre solution consiste pour la femme, à noter sa température orale, vaginale ou rectale tous les matins avant une quelconque activité physique. Durant le cycle menstruel, la courbe de température présente un profil bi-phasique. En effet, l'ovulation se traduit par une montée de la température basale du corps liée à la sécrétion de progestérone. Toutefois, cette technique simple d'utilisation ne peut que confirmer à posteriori la réalité de l'ovulation, au minimum 48 heures après celle-ci. Il ne s'agit donc pas d'un procédé permettant de déceler à l'avance la période de l'ovulation.

Il existe également un certain nombre de méthodes basées sur la variation des propriétés de la glaire cervicale au cours du cycle menstruel.

Il s'agit notamment de mesure de l'aspect qualitatif de la glaire cervicale dont la consistance varie, de mesure de la quantité de glaire, le volume maximal de sécrétion apparaissant un à deux jours avant l'ovulation, du dosage des immunoglobulines G et A dans le mucus cervical et de la mesure de la résistance électrique vaginale.

Des études théoriques et notamment les travaux de TSIBRIS ont montré que l'activité peroxydasique de la glaire cervicale variait au cours du cycle menstruel, cette activité restant à un niveau sensiblement stable en début de cycle, diminuant à partir du cinquième jour précédant l'ovulation pour passer par un minimum à la date de l'ovulation et remonter à son niveau initial deux jours après l'ovulation. Toutefois, les travaux qui ont été effectués sont des travaux de recherche susceptibles d'être mis en oeuvre en laboratoire mais non de fournir une méthode susceptible d'être utilisée par une femme elle-même en vue de la détermination approximative de la date de son ovulation suffisamment longtemps avant cette date.

La présente invention vise à remédier à ces inconvénients en fournissant un procédé qui repose sur l'évaluation de l'activité d'une

enzyme : la peroxydase. Cette enzyme décompose les peroxydes en dégageant de l'oxygène naissant qui sert à oxyder un accepteur, système incolore, qui se colore. La coloration de l'accepteur est proportionnelle à la quantité d'oxygène, donc à l'activité de l'enzyme.

5 Le procédé selon l'invention consiste, après prélèvement de la glaire, à diluer celle-ci, puis à ajouter un peroxyde et un réactif ou mélange de réactifs de révélation réagissant immédiatement, fournissant une gamme de colorations appréciables à l'oeil nu et stables dans le temps pendant plus de quinze minutes.

10 La glaire cervicale est prélevée à l'aide d'une seringue.

La glaire étant visqueuse, il convient de la liquéfier préalablement à la réaction, pour que la peroxydase soit accessible aux réactifs.

A cet effet, selon un mode de mise en oeuvre de ce procédé, la fluidification de la glaire est réalisée à l'aide de ficine. La ficine
15 possède un excellent pouvoir de solubilisation de la glaire, sans effet majeur sur l'activité de l'enzyme et le développement de la réaction colorée dont elle ne diminue que faiblement l'intensité.

Suivant le milieu réactionnel utilisé, le peroxyde mis en oeuvre peut être soit liquide et constitué par exemple par de l'eau oxygénée, soit solide et constitué par du peroxyde d'urée.
20

L'invention vise également un système de réaction colorée réagissant immédiatement, fournissant une gamme de colorations appréciables à l'oeil nu et stables dans le temps pendant plus de 15 minutes, et se conservant pendant plusieurs semaines à la température ambiante,
25 et pendant une durée beaucoup plus importante à une température de l'ordre de 4°C.

A cet effet, le système de réaction colorée comprend un mélange de :

- MBTH : diméthylbenzothiazoline hydrazone et de
- 30 - DMAB : acide diméthylaminobenzoïque.

Avec l'eau oxygénée comme peroxyde, une coloration bleue-violette est obtenue et la densité optique est lue à 590nm au spectrophotomètre.

Cette coloration est stable dans le temps pendant une durée
35 de 15 minutes à une heure environ. Il a été constaté que la conservation du système réactif et sa mise en oeuvre à un pH5 étaient tout-à-fait favorables d'une part à la conservation, et d'autre part à la réaction.

Selon un mode avantageux de mise en oeuvre de ce procédé, le rapport des concentrations DMAB/MBTH est de l'ordre de 50/1, et la concentration de DMAB est de 2,2 mM.

5 Les réactifs peuvent être mis en oeuvre sous une forme liquide, la glaire après dilution étant mélangée aux réactifs qui révèlent la réaction au bout d'une dizaine de minutes. Selon un autre mode de mise en oeuvre, les réactifs sont intégrés dans un gel de polymères organiques et sont mis en oeuvre sur un support constitué par une bande-lette ou un film gélifié.

10 En pratique, une femme désireuse de connaître la date de sa prochaine ovulation doit effectuer une analyse tous les deux jours, après le sixième jour de la menstruation, ces analyses devant être répétées jusqu'à ce qu'elle observe une remontée de l'activité peroxydase. Le résultat de chaque analyse sera reporté sur un graphique comportant
15 en abscisse une échelle des temps et en ordonnée un certain nombre de repères correspondant à un certain nombre de couleurs appartenant à un nuancier fourni avec le matériel d'analyse. Les différents points reportés sur le graphique permettront de tracer une courbe ayant la forme suivante : cette courbe présentera tout d'abord une zone à peu
20 près horizontale, puis une rupture correspondant à une baisse de l'activité peroxydasique, la courbe passant par un minimum le jour de l'ovulation, puis remontant pour atteindre sa valeur initiale sensiblement deux jours après l'ovulation. Le premier point d'inflexion se situant sensiblement quatre jours avant l'ovulation, permettra à la femme de déceler de
25 manière certaine et de façon anticipée la date de sa prochaine ovulation.

Comme il ressort de ce qui précède, l'invention apporte une grande amélioration à la technique existante en fournissant un procédé permettant à une femme de déterminer de façon anticipée et avec certitude la date de sa prochaine ovulation, à l'aide d'un matériel
30 simple de mise en oeuvre, fiable compte tenu de la nature des réactifs de révélation de l'activité peroxydase utilisés, et d'un prix de revient modéré.